

**ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ МОНОЦИТОВ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И
ПРОГРАММИРОВАНИЯ *IN VITRO***

А.С. Шляхтун¹, И.В. Митрофанова^{1,2}, Е.Г. Шаповалова¹

Научный руководитель: д.м.н. Чурина Е.Г

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

²Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук,

Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, 634009

E-mail: lonelynw59@gmail.com

**OPTIMIZATION OF MONOCYTE ISOLATION METHOD FOR CULTURING AND
PROGRAMMING *IN VITRO***

A.S. Shlyahzun¹, I.V. Mitrofanova^{1,2}, Ye.G. Shapovalova¹

Scientific Supervisor: Dr. Churina E.G.

¹National Research Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin Str., 36, 634050

²Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences,

Russia, Tomsk, Kooperativny Str., 5, 634009

E-mail: lonelynw59@gmail.com

Abstract. *Monocytes are considered to be precursors of the mononuclear phagocytes system. Due to the wide variety of macrophages functions nowadays investigation of monocytes and macrophages functions, properties and reactions is one of the most actual. The aim of the study was to choose and optimize a method of monocyte isolation from healthy donors. The result of our research as supposed was to receive the maximum number of cells with a purity that allows to carry out functional tests in vitro and to evaluate the expression of monocyte genes of interest. As a result, the protocol of monocyte isolation from human peripheral blood with CD14-positive selection with magnetic separation (MACS) was held. Optimal concentrations of cytokines for monocyte stimulation and for modelling monocyte properties in vitro in cell culture were found for further researches.*

Введение. Моноциты считаются клетками-предшественниками системы мононуклеарных фагоцитов, а макрофаги – одним из основных членов этой клеточной системы, выполняющим многообразные и многоплановые функции в поддержании целостности организма путем непосредственного участия в ликвидации патогена либо восстановления тканей при развитии воспалительных реакций в ответ на повреждение. В связи с этим наиболее актуальными на сегодняшний день являются исследования функций и реакций моноцитов и макрофагов в ответ на введение в организм имплантатов различного рода, при опухолевых и воспалительных заболеваниях для получения информации о возможности применения тех или иных материалов в живых организмах. Для проведения комплекса исследований необходимо выделение моноцитов как отдельной фракции крови. Однако для достижения достаточной чистоты выделяемой фракции и высокого показателя выживаемости моноцитов необходим тщательный подбор условий сбора и культивирования клеток (правильный выбор метода), что и являлось целью данного исследования.

Задачей работы являлись подбор и оптимизация метода выделения моноцитов от здоровых доноров. Результатом работы предполагалось получение максимально возможного количества клеток с чистотой, позволяющей провести функциональные пробы в культуре клеток *in vitro* и оценить экспрессию интересующих генов моноцитов.

Материалы и методы. Моноциты выделяли из побочных продуктов приготовления консервов крови – лейкоцитной пленки: разводили пленку буфером PBS, не содержащим Ca^{2+} и Mg^{2+} (Biochrom), в соотношении 1:1, полученную суспензию (35 мл) наслаивали на 15 мл фикола плотности 1.077 (Biochrom) в пробирке Leucosep™ (Greiner). Образцы центрифугировали 30 мин (Beckman Coulter) при 650g. Мононуклеарную фракцию собирали с интерфазы фиколл/сыворотка, переносили в свежие пробирки и два раза отмывали буфером PBS. Во время первого центрифугирования готовили непрерывный градиент на основе перколла (Percoll™ GE Healthcare). Для приготовления одного градиента смешивали 13,5 мл перколла, 1,5 мл 10 х минимальной основной среды Эрла, 15 мл среды Спиннера. Предыдущие пробирки промывали 4 мл PBS и содержимое вливали в пробирки со вторым градиентом. Полученные растворы центрифугировали при 420 gcf в течение 30 минут без перерывов. Верхний слой (PBS) и промежуточный слой (моноциты) отбирали в колбу объемом 50 мл, хорошо перемешивали, доводили объем смеси до 50 мл раствором PBS и центрифугировали при 420 gcf в течение 10 минут. Супернатант удаляли. Клеточный осадок ресуспендировали в 3 мл PBS и переносили в 15 мл пробирки. 50-миллилитровую пробирку промывали 4 мл раствора PBS, содержимое добавляли к смеси в 15-миллилитровой колбе и доводили объем раствором PBS до 10 мл. Клетки подсчитывали и центрифугировали при 420 gcf в течение 10 минут с перерывом. Клеточный осадок ресуспендировали в предварительно охлажденном MACS-буфере с добавлением микрогранул CD14 (95 мкл буфера и 5 мкл микрогранул). MACS-буфер готовили растворением 2,5 г бычьего сывороточного альбумина в 500 мл ФСБ и добавлением 2 мл 0,5М раствора ЭДТА, полученную смесь отфильтровывали в стерильную колбу. Полученную смесь инкубировали в течение 20 минут на ротаторе при температуре 4°C. Затем в пробирки добавляли MACS-буфер до 10 мл и полученную смесь центрифугировали при 420 gcf в течение 10 минут с перерывом. Во время центрифугирования готовили магнитный стенд и закрепляли LS-колонки (каждая не более чем для 1×10^8 клеток), под каждой колонкой поместили пустую центрифужную пробирку на 15 мл. Колонки промывали трижды по 3 мл MACS-буфера. Клеточный осадок после центрифугирования ресуспендировали в 1 мл охлажденного MACS-буфера и заливали в колонку. Далее трижды промывали содержимое колонки порциями по 3 мл MACS-буфера. Колонки сняли со стенда и поместили над новыми пробирками на 15 мл. CD14+ моноциты вымывали из колонки 10 мл MACS-буфера. Производили подсчет клеток и центрифугировали при 420 gcf в течение 10 минут. Полученная клеточная популяция содержала 95-98% моноцитов, что контролировалось при помощи анализа поверхностной экспрессии маркера моноцитов CD14 проточной цитометрией.

Моноциты культивировали в концентрации 1×10^6 клеток/мл в клеточной среде X-VIVO. Клетки инкубировали при температуре 37°C и 7,5% CO_2 в течение 6 суток.

Результаты. В данной работе представлена отработанная методика выделения моноцитов из периферической крови методом магнитной сепарации, которая, по данным Грачева и др. [1], обеспечивает наиболее высокую чистоту клеточной популяции (95-99%). Количество полученных клеток при работе с лейкостромбослом составило 40-70 млн, чего было достаточно для проведения

функциональных тестов *in vitro* (цитотоксического теста, теста стимуляции ангиогенеза, теста стимуляции пролиферации и др.), системы поляризации моноцитов в макрофаги про- либо противовоспалительного типа с помощью специфических стимулов (цитокинов, дексаметазона). Выделение клеток из лейкотромбослоя позволяет получить больший выход моноцитов, однако, согласно опубликованным ранее данным, многоэтапность выделения клеток увеличивает потери моноцитов [2]. С целью минимизации потерь клеток в процессе их выделения нами была опробована методика позитивной магнитной сепарации моноцитов из цельной крови, призванная снизить потери клеток на этапе, предшествующем сепарации. В результате была получена клеточная фракция с чистотой 88-92% и количеством, достаточным для проведения исследований культуры моноцитов/макрофагов *in vitro*.

В работе были также подобраны оптимальные условия для жизнеспособности и формирования специфических субтипов макрофагов: концентрации цитокинов: IL-4 (10 нг/мл), IFNgamma (100 нг/мл), TGFbeta (5 нг/мл), IL-10 (2 нг/мл), M-CSF (5 нг/мл) и концентрация дексаметазона 10^{-8} М.

Закключение. Исследованная нами методика не является безальтернативной. Применение находят и другие способы выделения моноцитов из лейкоцитарной фракции [3, 4]. В наших исследованиях была выбрана магнитная сепарация, поскольку на данном этапе развития методов выделения она показывает наилучшие результаты [1]. На основе проведенных экспериментальных исследований освоена методика выделения моноцитов из периферической крови человека при помощи магнитной сортировки (MACS) с использованием CD14-позитивной селекции. Было также протестировано действие цитокинов IL-4, IFNgamma, TGFbeta, IL-10 и различных концентраций M-CSF на жизнеспособность макрофагов в культуре в течение 6 суток.

Данное научное исследование выполнено при финансовой поддержке научного фонда имени Д.И. Менделеева.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грачев А.Н. Выделение моноцитов из крови человека для изучения влияния факторов внешней среды на иммунитет [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://inat.ru/ru/publications/2009-2012/vydelenie-monotsitov-iz-krovi-cheloveka-dlya-izucheniya-vliyaniya-faktorov-vneshnej-sredy-na-immunitet>. – 24.02.17.
2. Никифоров Н.Г. Тест-система для изучения влияния фармакологических агентов на активацию моноцитов крови человека // Современный мир, природа и человек. – 2011. – Т. 2, № 1. – С. 108-110.
3. Иммунология. Практикум: учебное пособие / Под ред. Л.В. Ковальчука, Г.А. Игнатьевой, Л.В. Ганковской. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 194 с.
4. Menck. K. Isolation of Human Monocytes by Double Gradient Centrifugation and Their Differentiation to Macrophages in Teflon-coated Cell Culture Bags [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.jove.com/video/51554/-?language=Russian>. – 27.02.17.